中国生物工程杂志 China Biotechnology,2017,37(7):48-55

DOI:10.13523/j.cb.20170710

巴斯德毕赤酵母甘油转运体的发现及功能研究*

战春君[1,2,3] 李 翔[1,2,3] 刘国强[1,2,3] 刘秀霞[1,2,3] 杨艳坤[1,2,3]** 白仲虎[1,2,3]**

(1 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 无锡 214122 2 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

(3 江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

摘要 目的:分离确认巴斯德毕赤酵母中甘油转运体并初步研究其功能。方法:通过生物信息学方法从 NCBI 数据库中查找可能的甘油转运体(*gt1*, GeneID: 8197545),并通过 DAS 软件对其跨膜结构域进行预测。通过 PCR 方法扩增该基因并将其与 EGFP 融合克隆到 pPICZ B 及 pRS424 载体进行亚细胞定位;同时将其与 pRS424 载体连接后电转到粟酒裂殖酵母中进行异源表达确定其功能;通过同源重组敲除 *gt1* 基因并在不同培养基中培养测定 *aox1* 基因表达量。结果:生物信息学显示与酿酒酵母中已经证明的甘油转运体(sugar transporter 1,*stl1*)类似,GT1 蛋白同样为具有疏水结构域的跨膜蛋白,同时亚细胞定位结果显示 GT1 蛋白定位于细胞膜上,包含有 *gt1* 基因的粟酒裂殖酵母可以在以甘油作为唯一碳源的培养基中生长而野生型不可以;在 *Δgt1* 突变体中 *aox1* 基因可以获得组成型表达。结论:分离并确认了巴斯德毕赤酵母中的甘油转运体 GT1,并初步证明其与 *aox1* 基因甘油阻遏相关。

关键词 巴斯德毕赤酵母 甘油转运体 甘油阻遏 亚细胞定位 同源重组

中图分类号 Q815

作为目前三种主要的外源表达系统,巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*, *P. pastoris*)表达系统由于其自身显著地优越性近年来被大量应用于外源蛋白表达进程中[1-2]。巴斯德毕赤酵母在外源蛋白表达过程中的优势主要源于其本身具有一个受甲醇严格调控的强启动子(promoter of alcohol, P_{AOX1})[3],统计结果表明,目前已经有超过 1 000 种外源蛋白(如 EGF 等)在巴斯德毕赤酵母中通过 P_{AOX1} 获得成功表达[4-5]。但是由于该启动子受到甲醇的严格诱导,其仅能在甲醇作为唯一碳源的培养基中被诱导[6],当培养基中存在甘油等碳源时,P_{AOX1} 会被严重抑制[7-8]。甲醇作为一种化工原料,在利用及存储过程中存在诸多缺陷,如耗氧量高、产能少等[9];同时,由于药品对残留甲醇含量具有严格的限制,因此通过甲醇诱导医药蛋白质表达进程中面临如何彻底消除甲醇的难题[10],这些均为基于 P_{AOX1} 启动子进行外源蛋白表达的巴斯德毕赤酵母的推广带来诸多不便,因此探究甘油抑制 P_{AOX1} 的分子机制并进行改良已经成为改善巴斯德毕赤酵母表达系统的一个主要研究方向。

目前对于甘油抑制 P_{AOX1} 的研究主要集中在对 P_{AOX1} 的改造[11-12],对于甘油抑制 P_{AOX1} 进程中甘油转运体的研究鲜见报道。甘油转运体作为细胞摄取胞外甘油的重要途径,其可能参与甘油阻遏 P_{AOX1} 过程,鉴于此,探究巴斯德毕赤酵母甘油转运体对于阐明甘油抑制 P_{AOX1} 具有重要意义。前期研究发现,粟酒裂殖酵母细胞不能在以甘油作为唯一碳源的培养基中生长,但是当将酿酒酵母甘油转运体(*stl1*)导入到粟酒裂殖酵母细胞之后,其可以在以甘油作为唯一碳源的培养基中生长[13],通过对其的研究发现,粟酒裂殖酵母本身不具备运输甘油的转运体,但是其体内具备代谢甘油所需要的酶类,因此可以用作研究甘油转运体的良好菌株[14]。本研究通过生物信息学及相关分子生物学实验对巴斯德毕赤酵母中甘油转运体进行分离与研究,以

收稿日期:2017-02-23 修回日期:2017-04-03

* 国家自然科学基金项目(面上项目)(31570034)、江苏省自然科学基金项目(BK20150148)、中央高校基本科研业务费专项资金(JUSRP51401A)资助项目

**通讯作者,电子信箱:yangyankun@jiangnan.edu.cn;baizhonghu@jiangnan.edu.cn

期为后续甘油抑制 P_{AOX1} 相关机制的研究提供一定的理论及实验依据。

1　材料与方法

1.1　材　料

1.1.1　菌株及质粒　巴斯德毕赤酵母 X-33,大肠杆菌 DH5α,质粒 pPICZ B,pEGFP-N1 均由本实验室保存;质粒 pRS424、粟酒裂殖酵母 yas56 由南京师范大学黄鹰教授赠送;pFA6a-KanMX6 载体由江南大学高晓东教授惠赠。

1.1.2　分子及化学试剂　LA DNA 聚合酶、dNTP Mix,10 × buffer 及限制性内切核酸酶 *Eco*RI、*Bam*HI、*Xba*I、*Hind*III、pMD19-T、DNA 连接酶等均购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa);胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒及 PCR 产物纯化试剂盒购自 Axygen 公司;酵母电转处理液(1mol/L 山梨醇,10 TE,1mol/L 乙酸锂,1mol/L DTT),酵母基因组提取液(苯酚:氯仿:异戊醇 = 25:24:1,SET 溶液)及酵母蛋白提取液[0.78% Tris-HCl *m/m*,0.058% EDTA *m/m*,PMSF (100mmol/L) 2% *V/m*],SET 溶液(0.5mol/L NaCl,0.2mol/L Tris-HCl,0.01mol/L EDTA,1% SDS),醇氧化酶加测溶液(4.2U/ml 辣根过氧化物酶,100mmol/L OPD,33mmol/L 磷酸钾缓冲液)均由本实验室配制。

1.1.3　培养基　培养基 YPD (1% 酵母膏,2% 蛋白胨,2% 葡萄糖),BMGY (酵母膏 1%,蛋白胨 2%,K_2HPO_4 0.1%,KH_2PO_4 1.18%,YNB 1.34%,500 × 生物素 1ml,甘油 10ml),BMMY (酵母膏 1%,蛋白胨 2%,K_2HPO_4 0.1%,KH_2PO_4 1.18%,YNB 1.34%,500 × 生物素 1ml,甲醇 5ml),Edinburgh minimal medium [3g/L 邻苯二甲酸氢钾,2.2g/L Na_2HPO_4,5g/L NH_4Cl,20g/L 葡萄糖,20ml/L salts (52.5g/L MgCl·$6H_2O$,0.735g/L $CaCl_2$·$2H_2O$,50g/L KCl,2g/L Na_2SO_4),1ml/L 维生素(1g/L 泛酸,10g/L 烟酸,10g/L 生物素),0.1ml/L 矿物质(5g/L 硼酸,4g/L $MnSO_4$,4g/L $ZnSO_4$·$7H_2O$,2g/LFeCl·$6H_2O$,0.4g/L钼酸,1g/L KI,0.4g/L $CuSO_4$·$5H_2O$,10g/L 柠檬酸)],EMMG 将 EMM 培养基中的葡萄糖用等量的甘油取代。

1.2　方　法

1.2.1　亚细胞定位表达载体构建　首先以 pFA6a-KanMX6 载体为模板通过 PCR 方法扩增 *kan* 基因,引物序列如表 1 所示,扩增出来的 PCR 产物经过 *Kpn*I 酶切之后与同样经过 *Kpn*I 酶切的 pRS424 质粒 4℃ 连接过夜,构建 pRS424-kan 重组载体。以提取的酵母基因组为模板,以 gt1-1 和 gt1-2 为引物扩增 *gt1* 基因,将扩增得到的 1.6kb PCR 产物经酶切(*Sma*I /*Xho*I)之后与 pRS424-*kan* 重组载体 4℃ 连接过夜,构建 pRS424-*kan*-*gt1* 重组载体;以 pEGFP-N1 质粒为模板,以 egfp-1 和 egfp-2 为引物通过 PCR 方法扩增 *egfp* 融合片段,然后通过 *Sma*I 与 *Spe*I 双酶切之后与 pRS424-*kan*-*gt1* 重组载体通过连接酶 4℃ 过夜连接最终构建亚细胞定位重组载体 pRS424-*kan*-*gt1*-*egfp*。

表 1　实验所用引物

Table1　Primer in this study

引物	序列
Kan-1	5′- CG GGTACC GGGTTAATTAAGGCGCGCCAGATC-3′
Kan-2	5′- CG CTCGAG CGTTTAAACTGGATGGCGGCGTTAG-3′
gt1-1	5′-GGC CCCGGG ATGGCAATCTATTCTCAACCCGTAAG-3′
gt1-2	5′-GGC CTCGAG GGCCCTTGACACGTCCTCTAC-3′
egfp-1	5′- GGC ACTAGT ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3′
egfp-2	5′-GC CCCGGG CTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3′
gt1s-1	5′-GC GAATTC CCGACAGAAGCAACCTCAGATCAACC -3′
gt1s-2	5′-GC GGATCC ATGGAGCGTTAATCCGGAGTGTAAGAG-3′
gt1x-1	5′-GC TCTAGA AACATCTCGTTTCGTGTGCTTGTGG -3′
gt1x-2	5′-GC AAGCTT CTTGCATTCGCTCAGGGCTCATTAC -3′
kan-3	5′-GC GGATCC CCGGTTAATTAA-3′
kan-4	5′-GC TCTAGAG AGCTCGTTTAAAC-3′

1.2.2 异源回补菌株构建 为研究 *gt1* 基因功能，将构建的 pRS424-*kan*-*gt1* 重组载体通过电转方法导入到粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*, *S. pombe*)细胞中(野生型粟酒裂殖酵母不能在以甘油作为唯一碳源的培养基中生长)，然后将其在含有 1mg/ml G418 抗生素的平板上 30℃培养。

1.2.3 *gt1* 基因敲除载体构建 通过同源重组的方法敲除巴斯德毕赤酵母中的 *gt1* 基因。首先以提取的酵母基因组为模板，以 gt1s-1 和 gt1s-2 为引物通过 LA 酶扩增 *gt1* 上游同源臂并将其与 pMD™19-T 载体相连，构建 pGT1UP 重组载体；然后以 gt1x-1 和 gt1x-2 为引物扩增 *gt1* 基因下游同源臂，通过 *Xba*I 和 *Hin*dIII 双酶切与之前构建的 pGT1UP 重组载体连接构建包含有 *gt1* 基因上下游同源臂的 pGT1UD 重组载体。以 pFA6a-KanMX6 质粒为模板，以 kan-3 和 kan-4 为引物扩增 *kan* 基因，通过 *Bam*HI 和 *Xba*I 双酶切之后与同样经过双酶切的 pGT1UD 重组载体经过 DNA 连接酶 4℃连接过夜构建 *gt1* 基因敲除载体。

1.2.4 酵母基因组提取 挑取单菌落接种于 YPD 液体培养基中，30℃ 230r/min 培养过夜，取 1ml 于 1.5ml EP 管中，10 000g 离心 3min，弃上清，经 PBS(pH7.2)清洗 1 次，10 000g 离心 3min，弃上清；加入与菌体等量的酸性玻璃珠，然后加入 400μl 苯酚/氯仿/异戊醇混合溶液以及 400μl SET 溶液，在震荡仪上剧烈震荡 30s，在冰上放置 1min(重复 10 次)；加入 200μl 1 × TE，迅速混合，10 000g 离心 10min，将上清转移到新的 1.5ml EP 管中，加入 1/10 体积的 NaAc 以及 2 倍体积的无水乙醇，-80℃放置 30min，10 000g 离心 10min，弃上清；加入 500μl 75% 乙醇 10 000g 离心 5min，弃上清，55℃烘干 20min，然后加入 60 ~ 100μl TE(含有 RNase，其终浓度约为 20μg/ml)，55℃处理 30min，-20℃保存。

1.2.5 酵母蛋白提取 将菌体接种于 YPD 液体培养基中，培养 16h 之后，OD_{600} 达到 1.6 左右时取适量菌体 4 000g 离心 5min，用灭菌处理的预冷的 PBS(pH7.2)清洗 2 次，每次 1min；转接到不同培养基中(甘油培养基、甘油 + 甲醇培养基、甲醇培养基)，初始 OD_{600} 为 0.05。培养 36h 后取 1ml 菌体加入 200μl 预冷的 PEBF(0.788 2% Tris-HCl, 0.058 5% EDTA，和 2μl 100mmol/L PMSF)，然后加入与菌体等量的酸洗玻璃珠，在震荡仪上破碎细胞(10 次，每次震荡 30s 间隔 1min)，10 000g 离心 1min 收集上清用于 Western blotting 检测。

1.2.6 酵母感受态制备及电转 将甘油管中的菌体接种于液体 YPD 培养基中，30℃ 230r/min 培养 24h，然后转接到 2 × YPD 液体培养基中，初始 OD_{600} = 0.05，30℃ 230r/min 培养至 OD_{600} = 1.3 ~ 1.5。3 000g 离心 2min，弃上清并用灭菌处理的 PBS(pH7.2)清洗 1 次，3 500g离心 1min 弃上清，加入 2ml 10 × TE(pH7.5)、2ml 10 × LiAc 及 0.5ml 1mol/lDTT，30℃ 50r/min 培养 45min。加入 300μl 灭菌处理的蒸馏水，4 000g 离心 5min，弃上清，用清洗液(25ml 预冷的无菌水与 20ml 遇冷的 1mol/L 山梨醇混合液)清洗，然后 4 000g 离心 5min 重复 5 次。最后用 3ml 1mol/L 山梨醇重悬菌体，最终 OD_{600} = 200，然后每份 80μl 保存用于电转。电转时先将电转杯在冰上预冷 10min，然后将制备的感受态细胞与线性化质粒(2 ~ 5μg)混匀之后加入电转杯中，冰上放置 5min，用纸巾擦净电转杯外壁水分，进行电转，所用电转仪为 BIO-RAD MicroPluser，程序为 PIC，电转一次，然后迅速加入 1ml 1mol/l 山梨醇，30℃ 孵育 1h，涂板，30℃倒置培养 。

1.2.7 AOX1 酶活检测 取不同养样本菌体，4 000g 离心 10min，弃上清；加入灭菌后的蒸馏水 500μl 清洗，4 000g 离心 2min，弃上清，重复上述操作；加入蒸馏水将 OD_{600} 调整到 4.0，取 500μl 菌体于新的 EP 管中 4 000g离心 3min，弃上清；加入与菌体等量的酸洗玻璃珠(425 ~ 600μm)，加入细胞裂解液重悬菌体，加入 PMSF 溶液使得终浓度为 1mmol/L；震荡破碎细胞，每振荡 30s 后，于冰上放置 1min，反复 10 次；8 000g 4℃离心 10min，将上清转移到新的 EP 管中；通过 Bradford 法对蛋白质进行定量；取等蛋白质量的上述细胞裂解液加入到 96 孔板中，加入 100μl 醇氧化酶检测溶液(空白对照加入 10μl 蒸馏水)；加入 3μl 甲醇溶液，室温(21 ~ 24℃)反应 20 ~ 30min；加入 30μl 2mol/L 终止液(0.1mol/L 亚硫酸)终止反应；在 492nm 处测定吸光值。

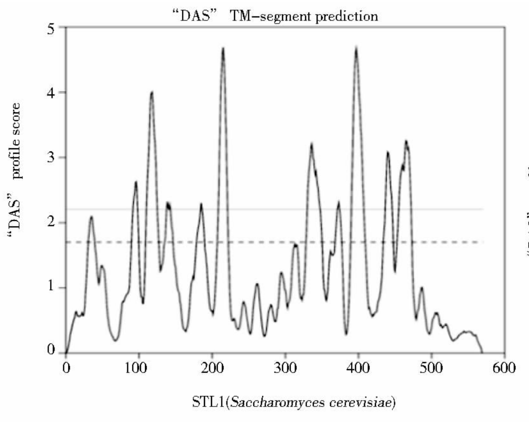
1.2.8 邻苯二酚法定性检测 AOX1 表达 检测方法参照 Stasyk OV 方法[15]，以邻苯茴香胺作为显色底物。

2 结 果

2.1 甘油转运体(GT1)跨膜结构分析

通过 SGD 数据库查找到与酿酒酵母甘油转运体(STL1)具有较高同源性的巴斯德毕赤酵母中可能的甘油转运体(GT1)，然后通过跨膜结构分析软件 DAS 对 GT1 蛋白及酿酒酵母甘油转运体 STL1 蛋白氨基酸跨膜结构域进行分析，结果如图 1 所示。通过图 1 可以看

出,与 STL1 蛋白类似,GT1 蛋白也具有疏水结构域,这暗示 GT1 蛋白在巴斯德毕赤酵母细胞内可能作为一个膜蛋白发挥作用。



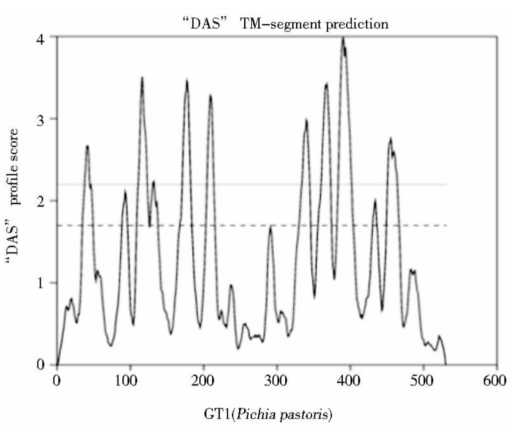


图 1　GT1 蛋白跨膜结构预测

Fig. 1　The transmembrane structure prediction of STL1 and GT1

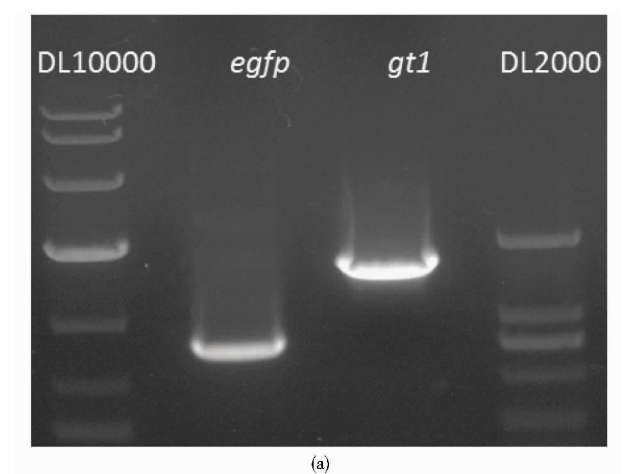
2.2　GT1 蛋白亚细胞表达载体构建及其定位

以提取的巴斯德毕赤酵母基因组为模板,以gt1-1/2 为引物,通过 PCR 方法扩增得到 *gt1* 基因,以 pEGFP-N1 质粒为模板,以 egfp-1/2 为引物,通过 PCR 方法扩增 *egfp* 基因(图 2a),然后将其与 pRS424-*kan* 重组表达载体相连(图 2b)构建巴斯德毕赤酵母及粟酒裂殖酵母亚细胞定位表达载体。

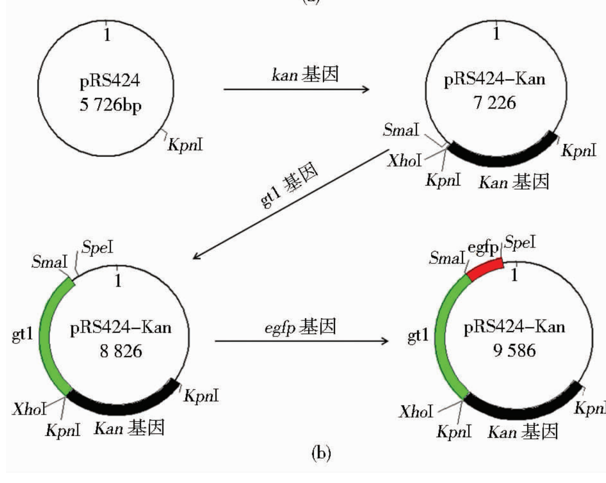
通过将 GT1 蛋白与 EGFP 蛋白融合表达对 GT1 蛋白在巴斯德毕赤酵母及粟酒裂殖酵母内的定位进行研究。通过图 3 可以看出,在巴斯德毕赤酵母当中与 GT1 蛋白融合表达的 EGFP 蛋白定位于细胞膜上,而单独的 EGFP 蛋白则游离在细胞质中;在粟酒裂殖酵母中,与 GT1 融合表达的 EGFP 蛋白定位于细胞膜上,而单独的 EGFP 蛋白则位于细胞质当中。这说明 GT1 蛋白可以引导 EGFP 蛋白定位于细胞膜,即 GT1 蛋白自身定位于细胞膜上。

2.3　GT1 功能研究

将野生型粟酒裂殖酵母 *S. pombe* (WT)以及导入 *gt1* 基因的粟酒裂殖酵母 *S. pombe* (pRS424-P. pGT1)分别培养在以葡萄糖作为碳源的 EMM + A + H + L + NaCl 培养基和以甘油代替葡萄糖的 EMMG + A + H + L + NaCl 培养基中(图 4),30℃ 培养 48h。通过图 4 可以看出,野生型及导入 *gt1* 基因的粟酒裂殖酵母均可以在以葡萄糖为唯一碳源的培养基中生长(图 4a),但是在以甘油作为唯一碳源的培养基中,野生型粟酒裂殖酵母不能生长而转化有毕赤酵母甘油转运体 *gt1* 基因的粟酒裂殖酵母可以生长(图 4b),这表明,*gt1* 基因可



(a)



(b)

图 2　亚细胞定位载体构建

Fig. 2　The construction of subcellular localization vector

(a) Gene cloning of *egfp* and gt1　(b) Construction of subcellular localization vector

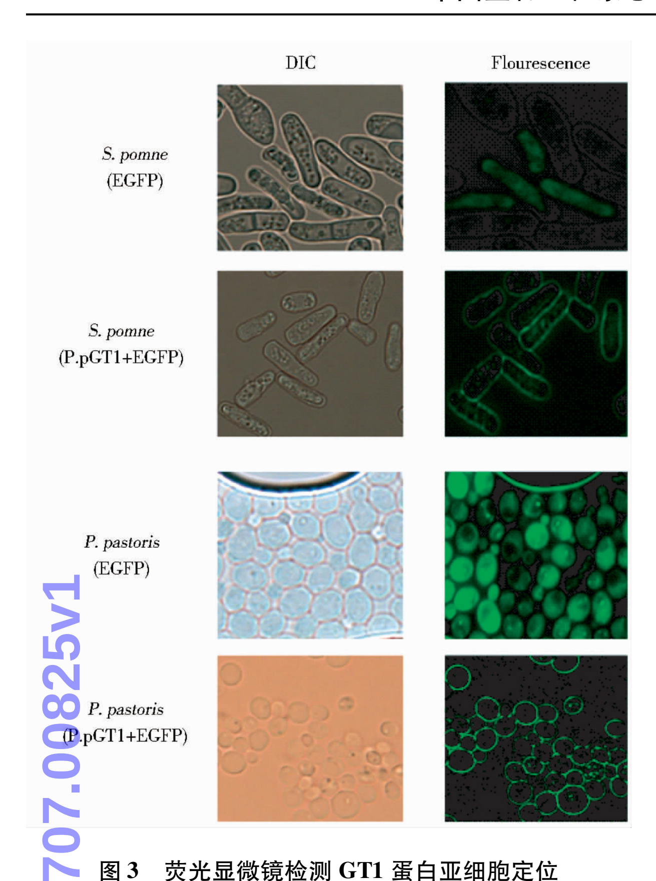


图 3 荧光显微镜检测 GT1 蛋白亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of GT1 by fluorescence detection

The left column was objected at the bright field the right column was objected at the 490nm gluorescence

以赋予粟酒裂殖酵母转运甘油功能进而促进其在甘油培养基中生长。

2.4 邻苯二酚法定性分析 AOX1 表达

将野生型巴斯德毕赤酵母以及 *gt1* 基因缺失突变体(Δ*gt1*)分别在 0.5% 甘油培养基、0.5% 甘油与0.5% 醇混合培养基以及0.5% 甲醇培养基中进行培养,24h 后各取 1ml OD_{600} =1 的菌体,4 000g/min 离心之后加入 AOX1 检测液,结果如图 5 所示,图 5 表明与野生型菌株相比,Δ*gt1* 突变体在 0.5% 甘油及 0.5% 甘油与 0.5% 甲醇混合培养基中 AOX1 酶活显著升高,但是在 0.5% 甲醇培养基中,突变体与野生型中的 AOX1 表达量差异不大。

2.5 AOX1 酶活测定

以提取的不同培养条件下野生型巴斯德毕赤酵母以及 *gt1* 基因缺失突变体菌株总蛋白质为研究对象,测定在甘油培养基、甘油与甲醇混合养基以及甲醇培养基 AOX1 酶活(图 6),结果表明,在甘油以及甘油与甲

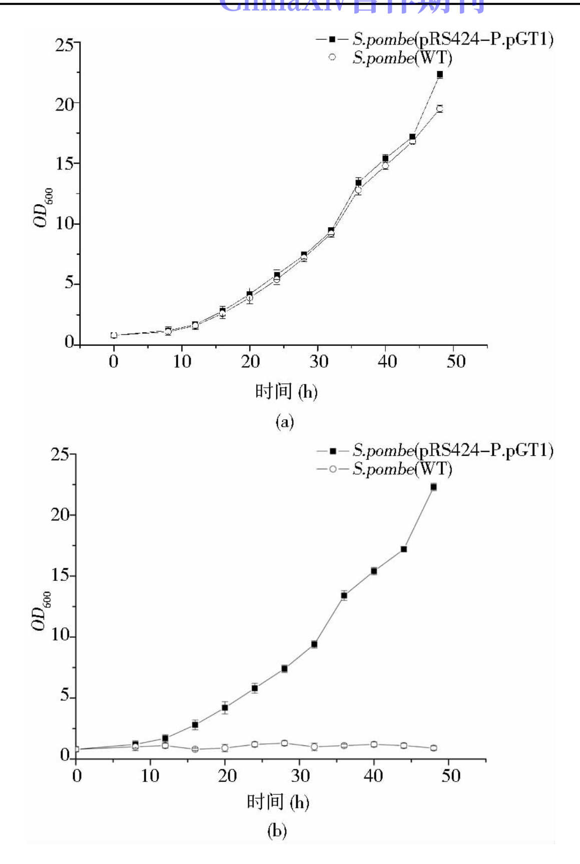


图 4 *S. pombe*(WT) 和 *S. pombe* (pRS424-P. pGT1)菌株在不同培养基中的生长状况

Fig. 4 Growth curve of *S. pombe*(WT) and *S. pombe* (pRS424-P. pGT1) in different medium

(a) *S. pombe*(WT) and *S. pombe* (pRS424-P. pGT1) were cultured in EMM + A + H + L + NaCl medium (b) *S. pombe*(WT) and *S. pombe* (pRS424-P. pGT1) were cultured in EMMG + A + H + L + NaCl medium

醇混合培养基中 AOX1 在突变体(Δ*gt1*)中的表达量(0.045U/ml/OD_{600}、0.057U/ml/OD_{600})显著高于其在野生型中的表达量(0.003U/ml/OD_{600}、0.004U/ml/OD_{600}),而在甲醇培养基中两者则差异不明显(0.062U/ml/OD_{600}、0.059U/ml/OD_{600})。这说明,*gt1* 基因缺失可以在一定程度上缓解甘油对于 P_{AOX1} 的抑制作用,进而提高 AOX1 酶活。

3 讨 论

巴斯德毕赤酵母表达系统目前已经被广泛的应用于外源蛋白的表达,统计资料表明,目前已经有超过 1 000种外源蛋白在巴斯德毕赤酵母当中获得成功表达,而在这中以甲醇诱导型启动子 P_{AOX1} 进行调控进而

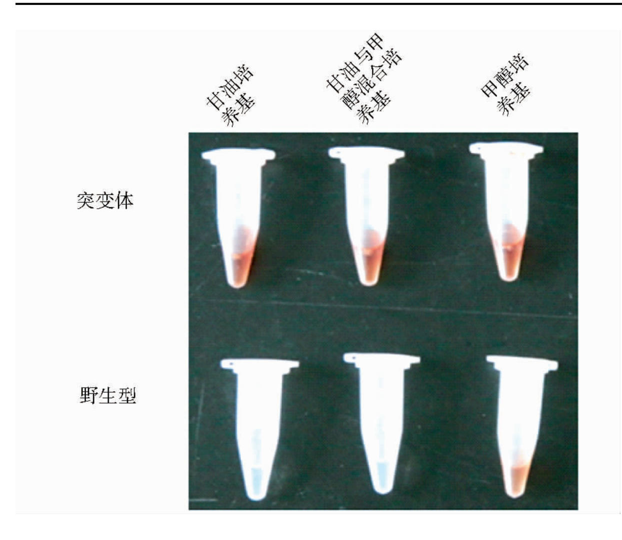


图 5　AOX1 表达量定性检测

Fig. 5　Enzyme activity detection of AOX1

获得表达的外源蛋白约占总数的 92.3%[16],这表明,相比于其他组成型启动子而言 P_{AOX1} 具有极高的启动效率。但是,由于 P_{AOX1} 受到甲醇的严格调控,而甲醇作为一种危险的化学物质其在使用及存储过程中均存在一定危险性,因此,深入探讨甘油等对 P_{AOX1} 的抑制机制具有极高的科学和实际意义。而甘油转运体作为细胞摄取胞外甘油的主要通路,其可以参与甘油对 P_{AOX1} 的抑制。

在本研究中,我们通过生物信息学及相关实验确定了巴斯德毕赤酵母中的甘油转运体,并对其在甘油抑制 P_{AOX1} 中的功能进行了初步研究,结果表明,*gt1* 基因缺失可以在一定程度上缓解甘油对于 P_{AOX1} 的阻遏作用,但是,在实验中我们发现,这种阻遏作用并不是彻底消除甘油对于 P_{AOX1} 的抑制,因此我们推断,在甘油抑制 P_{AOX1} 的过程中可能还有其他相关基因的参与。研究表明,Mxr1 蛋白作为调控 P_{AOX1} 的最主要的转录因子,其是 *aox1* 基因表达所必需的[12],并且进一步研究结果表明,Mxr1p 蛋白主要结合在 P_{AOX1} 上的 CYCCNR 碱基[12, 17-18],进而调控 *aox1* 基因的表达。在本研究中我们通过对 Pgt1 启动子序列分析发现,Pgt1 启动子中也存在相似的结合位点,因此推测 mxr1p 蛋白可能通过调控 *gt1* 基因的表达来调控胞内甘油的含量进而调控 *Aox1* 基因的表达,而这也正是本研究后续实验所需要研究的。同时,研究表明,巴斯德毕赤酵母中对 P_{AOX1} 的调控并不是由几个基因单独完成的,其涉及复杂的调控网络。例如,近年来研究发现,对 P_{AOX1} 起调控作用的诸多转录因子大体可以分为转录激活因子(包括 Mxr1、

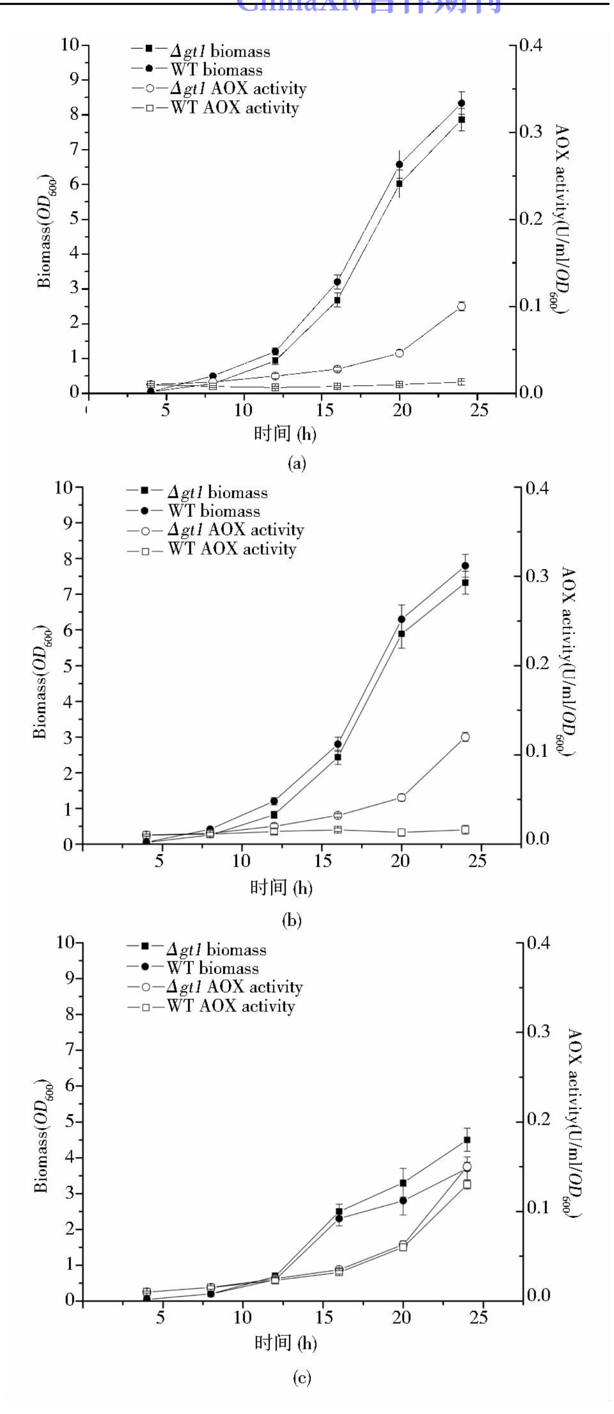


图 6　ELISA 测定不同菌株在不同培养基中 AOX1 酶活

Fig. 6　Detection enzyme activity of AOX1 in different strains cultured in different medium

(a) 0.5% glycerol medium　(b) 0.5% glycerol + 0.5% methanol medium　(c) 0.5% methanol medium

Trm2、Mit1 及 Prm1 等)[19-21] 及转录抑制因子(包括 Mig、Nrg1 等)[22-23]。并且这些转录激活因子及转录抑制因子之间存在相互作用。例如,研究发现,在 P_{AOX1} 中

Nrg1 具有与 Mxr1 相同在结合位点。不同培养基中两者与 P_{AOX1} 结合能力不同。例如,在甲醇培养基中,Mxr1 与 P_{AOX1} 结合能力强于 Nrg1,但是在甘油培养基中,Nrg1 结合能力强于 Mxr1,而结合能力的差异最终导致 P_{AOX1} 活性差异[23]。

总之,本文的研究确定了 GT1 是巴斯德毕赤酵母中的甘油转运体,并发现 *gt1* 的敲除可以缓解甘油对甲醇代谢的抑制作用。GT1 是如何参与到甘油和甲醇代谢调控网络中的,还需进一步研究。

参考文献

[1] Gellissen G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. Applied Microbiology And Biotechnology, 2000, 54(6): 741-750.

[2] Houard S, Heinderyckx M, Bollen A. Engineering of non-conventional yeasts for efficient synthesis of macromolecules: the methylotrophic genera. Biochimie, 2002, 84(11): 1089-1093.

[3] Hasslacher M, Schall M, Hayn M, et al. High-level intracellular expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. Protein Expression And Purification, 1997, 11(1): 61-71.

[4] Werten M W T, Van Den Bosch T J, Wind R D, et al. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. Yeast, 1999, 15(11): 1087-1096.

[5] Koutz P, Davis G R, Stillman C, et al. Structural comparison of the Pichia pastoris alcohol oxidase genes. Yeast (Chichester, England), 1989, 5(3): 167-177.

[6] 姚学勤. 甘油去阻遏表型巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的构建及其初步研究. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2009.

Yao X Q. Construction of *Pichia pastoris* Strain Deficient in Glycerol Catabolite Repression Ans, in the Presence of Glycerol, Expressing Heterologous Proteins Under Induction by Methanol. Beijing:Academy of Military Medical Sciences,2009.

[7] Cregg J M, Madden K R, Barringer K J, et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular Biology, 1989, 9(3): 1316-1323.

[8] Tschopp J F, Brust P F, Cregg J M, et al. Expression of the *lacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. Nucleic Acids Research, 1987, 15(9): 3859-3876.

[9] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Applied Microbiology And Biotechnology, 2014, 98(12): 5301-5317.

[10] Tachibana C, Yoo J Y, TagnE J B, et al. Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. Molecular And Cellular Biology, 2005, 25(6): 2138-2146.

[11] Stroman D W, Brust P F, Ellis S B, et al. Regulatory Region for Heterologous Gene Expression in Yeast:US, EP0483115. 1992.

[12] Lin-Cereghino G P, Godfrey L, De La Cruz B J, et al. Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. Molecular And Cellular Biology, 2006, 26(3): 883-897.

[13] Kayingo G, Martins A, Andrie R, et al. A permease encoded by STL1 is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. Microbiology-Sgm, 2009, 155(5):1547-1557.

[14] Klein T, Heinzle E, Schneider K. Metabolic fluxes in *Schizosaccharomyces pombe* grown on glucose and mixtures of glycerol and acetate. Applied Microbiology And Biotechnology, 2013, 97(11): 5013-5026.

[15] Stasyk O V, Nazarko T Y, Sibirny A A. Methods of Plate Pexophagy Monitoring and Positive Selection for *ATG* Gene Cloning in Yeasts//Klionsky D J. Autophagy: Lower Eukaryotes And Non-Mammalian Systems. US: Elsevier Inc, 2008: 229-239.

[16] Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnology Advances, 2012, 30(5): 1108-1118.

[17] Kranthi B V, Kumar R, Kumar N V, et al. Identification of key DNA elements involved in promoter recognition by Mxr1p, a master regulator of methanol utilization pathway in *Pichia pastoris*. Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms, 2009, 1789(6-8): 460-468.

[18] Parua P K, Ratnakumar S, Braun K A, et al. 14-3-3 (Bmh) proteins inhibit transcription activation by Adr1 through direct binding to its regulatory domain. Molecular And Cellular Biology, 2010, 30(22): 5273-5283.

[19] Zhang W H, Smith L A, Plantz B A, et al. Design of methanol feed control in *Pichia pastoris* fermentations based upon a growth model. Biotechnology Progress, 2002, 18(6): 1392-1399.

[20] Sasano Y, Yurimoto H, Kuriyama M, et al. Trm2p-dependent derepression is essential for methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. Fems Yeast Research, 2010, 10(5): 535-544.

[21] Parua P K, Ryan P M, Trang K, et al. *Pichia pastoris* 14-3-3 regulates transcriptional activity of the methanol inducible transcription factor Mxr1 by direct interaction. Molecular Microbiology, 2012, 85(2): 282-298.

[22] Leao-Helder A N, Krikken A M, Van Der Klei I J, et al. Transcriptional down-regulation of peroxisome numbers affects selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*.

Journal Of Biological Chemistry, 2003, 278 (42): 40749-40756.

[23] Wang X, Wang Q, Wang J, et al. Mit1 transcription factor mediates methanol signaling and regulates the alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter in *Pichia pastoris*. Journal Of Biological Chemistry, 2016, 291(12): 6245-6261.

Identification of Glycerol Transporter in *Pichia pastoris* and Function Research

ZHAN Chun-jun[1,2,3] LI Xiang[1,2,3] LIU Guo-qiang[1,2,3] LIU Xiu-xia[1,2,3]
YANG Yan-kun[1,2,3] BAI Zhong-hu[1,2,3]

(1 National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)
(2 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)
(3 The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract Object Separation and identification glycerol transporter in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) and studing its function. Methods: the candidate glycerol transporter (gt1, GeneID: 8197545) was found in NCBI database by bioinformatics, and transmembrance structure was predicted by DAS. Targeted gene fused with *egfp* was cloned into pPICZ B and pRS424 to study its location in cells; recombinant plasmid (*gt1* + pRS424) was transformed into *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) to study its function; In order to study the relationship between gt1 and aox1, *gt1* was deleted by homologous recombination, and enzyme activity of AOX1 in wild and mutant were detected. Results: according to results of bioinformatics, it was found that GT1 share the same transmembrance regions with sugar transporter 1 (*stl1*) which has been identified as a glycerol transporter in *Saccharomuces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), results of subcellular localization showed that GT1 located on membrance, *S. pombe* transformed into *gt1* could growth on glycerol medium, but wild type could not, which suggested that GT1 could absorbed glycerol from medium to support cells growth. Moreover, AOX1 achieved constitutive expression in *Δgt1*. Conclusion: glycerol transporter (*gt1*) in *P. pastoris* was separated and identified, and its function in glycerol repression was preliminarily clarified.

Key words *Pichia pastoris* Glycerol transporter Glycerol repression Subcellular localization Homologous recombination